

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni (*True Experimental Research*) dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Jenis ekstrak yang digunakan yaitu ekstrak kulit buah petai. Konsentrasi ekstrak kulit buah petai yang digunakan yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang, Jl. Raya Tlogomas No.246 Malang. Pada tanggal 15 Oktober 2019 - 20 Januari 2020.

3.3 Populasi dan Teknik Sampling

3.3.1 Populasi

Menurut Gunawan (2013) populasi adalah keseluruhan objek penelitian, baik hasil menghitung maupun pengukuran (kuantitatif atau kualitatif) dari karakteristik tertentu yang akan dikenai generalisasi. Populasi dalam penelitian ini adalah satu cawan petri *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Malang.

3.3.2 Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling*, yaitu cara pengambilan sampel dari anggota populasi dengan menggunakan acak tanpa memperhatikan strata (tingkatan) dalam anggota populasi tersebut (Gunawan, 2013). Sampel adalah bagian dari populasi yang memiliki karakteristik atau keadaan tertentu yang akan diteliti (Gunawan, 2013). Sampel dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *Shigella dysenteriae* yang sudah dikulturkan dalam media NA dan telah diinkubasi selama 7x24 jam pada suhu 37°C. Besar sampel dalam penelitian akan dianggap cukup baik apabila ditentukan berdasarkan rumus berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

r: replikasi (jumlah ulangan)

t: treatment (jumlah perlakuan)

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Maka dari hasil perhitungan diatas, didapatkan pengulangan perlakuan sebanyak 4 kali per perlakuan.

3.4 Jenis Variabel

Pada penelitian ini terdapat 3 jenis variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol. Penjelasannya sebagai berikut:

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2013). Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kulit buah petai (*Parkia speciosa* Hassk.) dalam berbagai konsentrasi yang digunakan yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi sebab akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2013). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditandai dengan munculnya zona hambat sebagai tanda adanya hambatan pertumbuhan hingga kematian bakteri pada medium agar.

3.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel independen terhadap dependen tidak dipengaruhi faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah proses pengekstrakan ekstrak kulit buah petai (*Parkia speciosa* Hassk.) lama maserasi, temperature inkubasi, lama inkubasi, suhu, dan pH.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Agar tidak terjadi kesalahan makna dalam tiap variabel maka perlu didefinisikan. Adapun definisi tiap variabel yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

- a. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati maupun hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Farmakope Indonesia dalam DepKes RI, 2000). Jenis ekstrak yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah petai (*Parkia speciosa* Hassk.).
- b. Konsentrasi larutan merupakan parameter yang menyatakan komposisi atau perbandingan kuantitatif antara zat terlarut dengan pelarut (Laksono, 2004). Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%.
- c. Diameter zona hambat adalah diameter zona bening yang terbentuk untuk menunjukkan tidak terdapatnya pertumbuhan bakteri (Ningsih, 2013), dimana pengukuran menggunakan alat jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).
- d. Lama maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut melalui beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (Depkes, 2000). Lama maserasi ekstrak kulit buah petai dengan merendam ke dalam larutan etanol selama 2 x 24 jam.
- e. Temperature inkubasi merupakan suhu yang digunakan untuk menyimpan cawan petri yang sudah diinokulasi dengan bakteri *Shigella dysenteriae*.

- f. Lama inkubasi yaitu waktu yang digunakan untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak kulit buah petai terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.
- g. Suhu merupakan besaran yang menyatakan derajat panas atau dinginnya suatu benda. Suhu optimum untuk pertumbuhan *Shigella dysenteriae* adalah 37°C.
- h. pH adalah derajat keasaman yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan suatu larutan. pH media yang dikendalikan untuk pertumbuhan *Shigella dysenteriae* adalah 7.

3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dibagi menjadi 3 tahap, yaitu: tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap pengamatan. Berikut penjelasan pada masing-masing prosedur penelitian:

3.6.1 Persiapan Penelitian

Pada tahapan ini, terdapat beberapa perlakuan. Yakni persiapan alat dan bahan yang akan digunakan untuk penelitian, yaitu sebagai berikut:

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

- | | | |
|-----|--------------------|--------------|
| 1. | Autoklaf | 1 buah |
| 2. | Cawan petri | 9 buah |
| 3. | Rak tabung reaksi | 1 buah |
| 4. | Tabung reaksi | 8 buah |
| 5. | Bunsen | 1 buah |
| 6. | Erlenmeyer | 500ml 2 buah |
| 7. | Inkubator | 1 buah |
| 8. | Pipet tetes | 3 buah |
| 9. | Magnetik stirrer | 1 buah |
| 10. | Jangka sorong | 1 buah |
| 11. | Timbangan analitik | 1 buah |
| 12. | Botol flakon | 6 buah |
| 13. | Enkas | 1 buah |

14. Jarum ose 1 buah

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Kertas label 1 buah
2. Kulit buah petai 3000gram
3. Bakteri *Shigella dysenteriae* 1 tabung reaksi
4. Medium NA (Nutrient Agar) 16,8 gram
5. Aquades 100 ml
6. Etanol 96% 2,5 liter
7. Kapas 100 gram
8. Aluminium foil 1 pak
9. Paper disk 32 lembar
10. Plastik wrap 1 rol
11. Larutan Barium Clorida (BaCl_2) 1% 0.05 ml
12. Asam Sulfat (H_2SO_4) 1% 9,95 ml

3.6.2 Pelaksanaan Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa langkah kerja untuk mendukung jalannya penelitian, yaitu:

a. Sterilisasi Alat

1. Mencuci semua alat dengan sabun hingga bersih kemudian dikeringkan.
2. Membungkus semua peralatan dengan kertas sampul dan mensterilkan didalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

b. Pembuatan NA (Nutrient Agar)

1. Menimbang bubuk NA
2. Menambahkan aquades steril pada bubuk NA sesuai dengan kebutuhan
3. Mengaduk bahan hingga homogen
4. Merebus larutan NA hingga tercampur menggunakan magnetik stirrer
5. Mendinginkan larutan NA dalam water bath pada suhu $45-47^\circ\text{C}$, kemudian dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 15 ml
6. Membiarkan suspensi padat dan menyimpannya selama 24 jam

c. Pembuatan Suspensi

Larutan Mac Farland 0,5 digunakan dengan membandingkan kekeruhan biakan bakteri dalam media cair dengan kepadatan $1,5 \times 10^8$ sel/ml dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Membuat larutan dengan memasukkan 1 ml Barium Clorida (BaCl_2) 1%
2. Membuat larutan dengan memasukkan 9,95 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%
3. Mencampur kedua larutan pada tabung reaksi, dengan perbandingan 0,1 BaCl_2 1% dan 9,9 ml H_2SO_4
4. Menyimpan larutan dalam suhu kamar dan tempat gelap serta tidak terkena sinar matahari langsung
5. Mengambil 3-5 koloni biakan *Shigella dysenteriae* dan diencerkan dengan aquades sampai tercapai larutan homogeny untuki mendapatkan kepadatan bakteri, yaitu 3×10^8 sel/mm
6. Membandingkan dengan larutan standar Mac Farland 1. Apabila biakan bakteri *Shigella dysenteriae* belum sama dengan larutan pembanding, maka ditambahkan aquades. Dan jika terlalu keruh, dapat ditambahkan bakteri dengan jarum ose

Tabel 3.1 Standar Mac Farland

No Tabung	BaCl 1% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Jumlah (108/ml)	koloni
0,5	0,05	9,95	1,5	
1	0,1	9,9	3	
2	0,2	9,8	6	
3	0,3	9,7	9	
4	0,4	9,6	12	
5	0,5	9,5	15	
6	0,6	9,4	18	
7	0,7	9,3	21	
8	0,8	9,2	24	
9	0,9	9,1	27	
10	1	9	30	

(Riyanto dalam Maslikah, 2014)

d. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Petai (*Parkia speciosa* Hassk.)

1. Mencuci bersih kulit buah petai sebanyak 3 kg
2. Kulit buah petai dikeringkan dengan diangin-anginkan selama 3 minggu, kemudian dipotong kecil
3. Menghaluskan bahan yang telah kering menggunakan blender hingga halus dan menjadi serbuk
4. Menimbang serbuk kulit buah petai
5. Melakukan pembasahan serbuk kulit buah petai dengan pelarut etanol
6. Memasukkan serbuk kulit buah petai yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, lalu diratakan dengan menambahkan pelarut hingga bahan terendam
7. Menutup toples dengan rapat selama 2 x 24 jam dan dishaker diatas shaker digital 50 rpm
8. Melakukan remaserasi sebanyak 2 kali pada ampas dengan cara memasukkan kembali ke dalam toples dan menambahkan pelarut hingga terendam (minimal 5 cm diatas permukaan serbuk), kemudian dibiarkan selama 24 jam dan dishaker
9. Hasil ekstrak cair pertama sampai terakhir kemudian dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator water bath yang memerlukan waktu selama 1 jam untuk evaporasi
10. Dari serbuk kulit buah petai 900 gram dan di ekstraksi menggunakan pelarut etanol sebanyak 2500 ml dihasilkan ekstrak kental sebanyak 60 ml
11. Melakukan pengenceran terhadap ekstrak kulit buah petai sesuai konsentrasi yang diinginkan, yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%. Larutan konsentrasi ekstrak kulit buah petai dengan pembuatan 10 ml pengenceran menggunakan aquades, digunakan rumus sebagai berikut:

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

Keterangan :

V1: Volume yang dicari

N1: Konsentrasi Awal

V2: Volume yang diinginkan

N2: Konsentrasi yang diinginkan

Konsentrasi 5% dengan Perhitungan

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 100\% = 10 \times 5\%$$

$$V1 = \frac{50}{100}$$

$$V1 = 0,5$$

0,5 ml ekstrak + 9,5 ml aquades

0,5 ml ekstrak kulit buah petai dicampur dengan 9,5 ml aquades untuk mendapatkan konsentrasi 5%

Konsentrasi 10% dengan Perhitungan

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 100\% = 10 \times 10\%$$

$$V1 = \frac{100}{100}$$

$$V1 = 1$$

1 ml ekstrak + 9 ml aquades

1 ml ekstrak kulit buah petai dicampur dengan 9 ml aquades untuk mendapatkan konsentrasi 10%

Konsentrasi 15% dengan Perhitungan

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 100\% = 10 \times 15\%$$

$$V1 = \frac{150}{100}$$

$$V1 = 1,5$$

1,5 ml ekstrak + 8,5 ml aquades

1,5 ml ekstrak kulit buah petai dicampur dengan 8,5 ml aquades untuk mendapatkan konsentrasi 15%

Konsentrasi 20% dengan Perhitungan

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 100\% = 10 \times 20\%$$

$$V1 = \frac{200}{100}$$

$$V1 = 2$$

2 ml ekstrak + 8 ml aquades

2 ml ekstrak kulit buah petai dicampur dengan 8 ml aquades untuk mendapatkan konsentrasi 20%

Konsentrasi 25% dengan Perhitungan

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 100\% = 10 \times 25\%$$

$$V1 = \frac{250}{100}$$

$$V1 = 2,5$$

2,5 ml ekstrak + 7,5 ml aquades

2,5 ml ekstrak kulit buah petai dicampur dengan 7,5 ml aquades untuk mendapatkan konsentrasi 25%

Konsentrasi 30% dengan Perhitungan

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 100\% = 10 \times 30\%$$

$$V1 = \frac{300}{100}$$

$$V1 = 3$$

3 ml ekstrak + 7 ml aquades

3 ml ekstrak kulit buah petai dicampur dengan 7 ml aquades untuk mendapatkan konsentrasi 30%

e. Inokulasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

1. Mendinginkan selama beberapa saat media NA untuk menghilangkan uap air pada cawan petri
2. Mengambil sediaan bakteri *Shigella dysenteriae* sebanyak 10 ml kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^8
3. Mengambil suspensi *Shigella dysenteriae* yang telah diencerkan dengan kapas lidi, kemudian menginokulasi secara merata pada permukaan NA secara zig-zag

4. Mencilupkan paper disc ke dalam wadah yang berisi ekstrak kulit buah petai sesuai dengan konsentrasi menggunakan pinset steril
5. Memasukkan paper disk yang telah dicelupkan ke dalam ekstrak kulit buah petai pada media NA dan ditanam tepat ditengah-tengah media
6. Menutup cawan petri kemudian diputar 180°C diatas api bunsen untuk lebih mensterilkan cawan petri
7. Membungkus dan melapisi bagian tepi cawan petri menggunakan plastik wrap
8. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik

f. Pengamatan

1. Setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, kemudian meletakan cawan petri secara berurutan di atas meja sesuai dengan perlakuannya
2. Meletakkan cawan petri secara terbalik agar tutup cawan petri tidak mudah terbuka
3. Mengukur zona hambat yang muncul pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong

3.6.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial. Rancangan jenis ini memiliki ciri-ciri dimana penelitian yang dilakukan di lingkungan laboratorium dianggap homogen. Rancangan ini merupakan rancangan yang perlakuannya dilakukan dan diletakan secara acak pada setiap percobaan. Seluruh unit percobaan ini berarti memiliki peluang yang sama untuk menerima perlakuan. Denah Rancangan Acak Kelompok pada penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan dan 2 perlakuan kontrol yang masing-masing diulang 4 kali. Penempatan setiap unit eksperimen dilakukan dengan urutan kelompok, yaitu:

A1, A2, A3, A4	B1, B2, B3, B4	C1, C2, C3, C4	D1, D2, D3, D4
E1, E2, E3, E4	F1, F2, F3, F4	K-1, K-2, K-3, K-4	K+1, K+2, K+3, K+4

Gambar 3.1 Denah Rancangan Acak Kelompok

Keterangan:

A adalah ekstrak kulit buah petai konsentrasi 5% (*Parkia speciosa* Hassk.)

B adalah ekstrak kulit buah petai konsentrasi 10% (*Parkia speciosa* Hassk.)

C adalah ekstrak kulit buah petai konsentrasi 15% (*Parkia speciosa* Hassk.)

D adalah ekstrak kulit buah petai konsentrasi 20% (*Parkia speciosa* Hassk.)

E adalah ekstrak kulit buah petai konsentrasi 25% (*Parkia speciosa* Hassk.)

F adalah ekstrak kulit buah petai konsentrasi 30% (*Parkia speciosa* Hassk.)

K+ adalah kontrol positif

K- adalah kontrol negative

1 adalah pengulangan ke-1

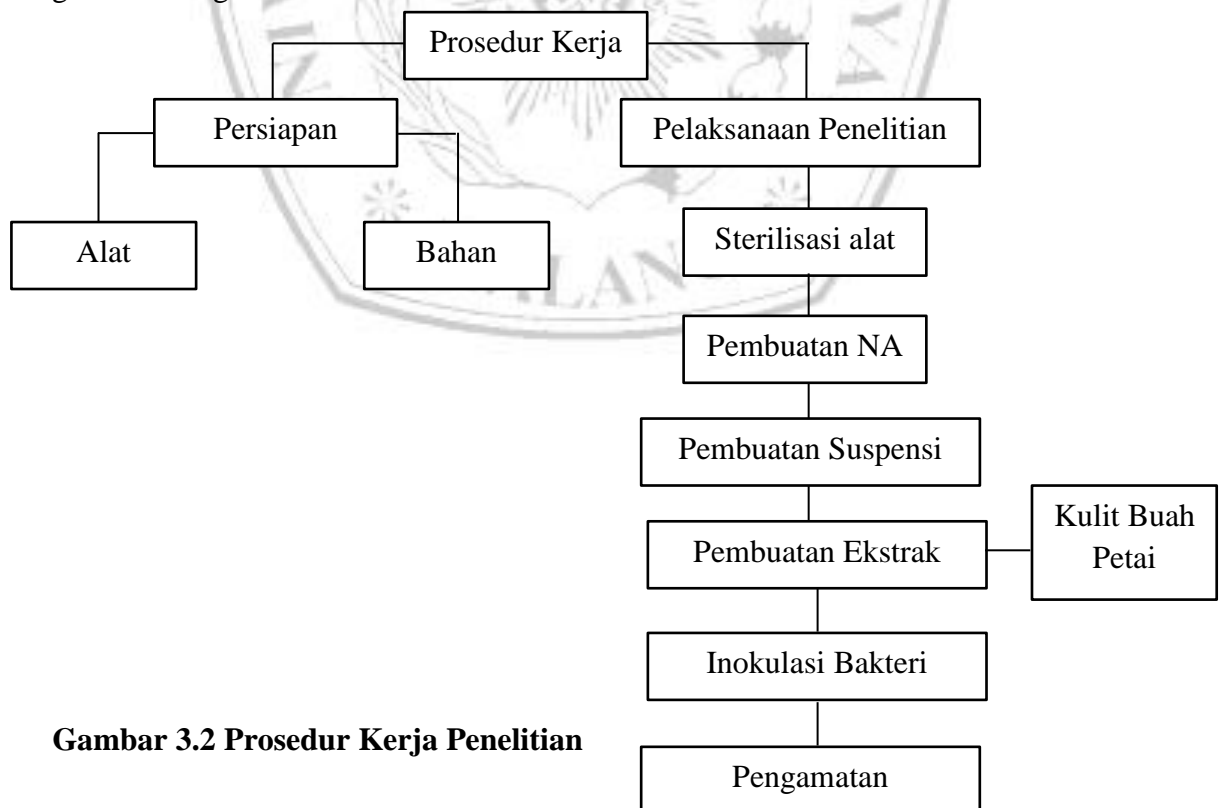
2 adalah pengulangan ke-2

3 adalah pengulangan ke-3

4 adalah pengulangan ke-4

3.6.4 Pelaksanaan dan Alur Penelitian

Beberapa prosedur kerja disusun kedalam bagan prosedur kerja pada gambar sebagai berikut:



Gambar 3.2 Prosedur Kerja Penelitian

3.7 Metode Pengumpulan Data

Metode pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah melalui observasi eksperimen yaitu dengan teknik pengambilan data secara langsung dengan cara mengamati dan mencatat aktivitas yang sedang berlangsung. Observasi di laboratorium ini difokuskan pada obyek perlakuan yaitu variabel terikat yang diberi perlakuan, kemudian data yang diperoleh diaplikasikan ke dalam bentuk tabel. Tabel tersebut akan mencakup data rerata pengukuran diameter zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* dengan bantuan alat jangka sorong. Observasi pengukuran terhadap diameter zona hambat yang terbentuk ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 3.2 Pengukuran Diameter Zona Hambat Bakteri *Shigella dysenteriae*

No.	Perlakuan	Ulangan ke-	Total Diameter Zona Hambat	Rerata
1.				
2.				

3.8 Teknik Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis deskriptif kuantitatif, dimana pengolahan data dilakukan menggunakan uji normalitas (*Liliefors*) dan uji homogenitas (*Barlett*) untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal dan apakah varian data homogen. Jika data tidak homogen maka data harus ditransform dahulu kemudian baru uji homogenitasnya. Lalu lanjut untuk mengetahui perbedaan perlakuan pada hasil penelitian dilakukan uji dengan analisis anava stu jalur. Kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan yang bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik dalam penelitian.